

**ФЕРМЕНТАТИВНОЕ БИОТЕСТИРОВАНИЕ ПОЧВ: СРАВНЕНИЕ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ТОКСИКАНТАМ МОНО-, БИ- И ТРИ-
ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМ**

О. С. Сутормин,^{1,} Е. М. Колосова,¹ Е. В. Немцева,^{1, 2} О. В. Искорнева,¹
А. Е. Лисица,¹ В. С. Матвиенко,¹ Е. Н. Есимбекова,^{2, 1} В. А. Кратасюк^{1, 2}*

¹ *Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041*

^{и 2} *Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036;*

** электронный адрес: OSutormin@sfu-kras.ru*

В работе исследовали возможности использования ферментативных систем разной сложности в качестве биотестов для оценки степени загрязнения почв. Для этого определяли чувствительность моно-, би- и три- ферментной системы к пестицидам и ионам меди в воде и водных экстрактах из почв, различающихся гранулометрическим составом и содержанием гумуса. Системы включали NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазу и люциферазу светящихся бактерий, а также лактатдегидрогеназу. Для каждого тестируемого образца получали токсикологический параметр ЕС₂₀, отражающий предел чувствительности тест-системы к загрязнителю. Установлено, что повышение сложности системы (от моно- до три- ферментной) увеличивает чувствительность биотеста, в некоторых случаях на несколько порядков. Полученные результаты говорят о возможности увеличения чувствительности ферментативных биотестов к токсикантам в почве

за счёт удлинения цепи сопряжения ферментов. Действие экстрактов незагрязненных почв разных типов на ферментативные системы также различается, что создаёт возможность конструирования специализированных ферментативных биотестов.

Ключевые слова: биолюминесцентный анализ, почва, ферментативные биотесты, экологический мониторинг, бактериальная люцифераза, NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза, лактатдегидрогеназа, сопряженные ферментативные реакции

Принятые сокращения: FMN – флавиномононуклеотид, L – люцифераза; LDH – лактатдегидрогеназа, R – NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза.

В настоящее время остро стоит проблема загрязнения окружающей среды и особенно почв, используемых в сельском хозяйстве. Деградация почв происходит вследствие их эрозии и дефляции, дегумификации, загрязнения техногенными радионуклидами, тяжелыми металлами, остатками пестицидов, удобрений и иными веществами, в разной степени опасными для здоровья человека и оптимального функционирования почвы. В утвержденной Правительством РФ концепции ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности РФ (2009—2013 гг.)» качество почвы ряда регионов России характеризуется как критическое.

Для целей мониторинга экологической безопасности служат новые методы контроля токсичности почв, а также других компонентов природных и

сельскохозяйственных экосистем (Добровольский, 2003; Колесников и др., 2006). Одним из важных современных приемов исследования в области экотоксикологии является биотестирование. Методы биотестирования используются с целью установления степени токсического действия химических, физических и биологически неблагоприятных факторов среды, потенциально опасных для живых компонентов экосистемы (МР 11-1/134-09, 2000). Последние годы активное развитие получило использование в качестве тест-объектов вместо живых организмов – ферментативных систем различной сложности (Терехова, 2011; Kratasyuk, Esimbekova, 2015).

Цель настоящей работы – сравнить чувствительности моно-, би- и триферментной систем к пестицидам и ионам металлов для оценки возможности их использования в качестве биотестов для экологического мониторинга почв.

Материал и методика

Характеристика исследуемых почв и токсикантов. Объектом исследования являлись 5 эталонных образцов почв (песок, легкий суглинок, средний суглинок, тяжелый суглинок, чернозём), отобранных в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84 (2008). Экстракты из почв были приготовлены с использованием дистиллированной воды по следующей технологии: навеску почвы 5 г разводили 5-кратным объёмом дистиллированной воды. Данную смесь выдерживали 30 мин при непрерывном перемешивании при комнатной температуре, затем фильтровали. В качестве загрязняющих веществ выбраны пестициды малатион и диазинон, а также хлорид меди (II).

Анализ влияния образцов почв на активность ферментативных систем. Активность NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы (R) оценивали по изменению оптической плотности раствора при 340 нм с использованием спектрофотометра Cary 5000 (Agilent Technologies, США). Реакционная смесь: 660 мкл 0.05 М калий-натрий фосфатного буфера pH 7.25; 40 мкл R (0.15 ед. акт./мл), 30 мкл 0.5 мМ FMN, 150 мкл 4 мМ NADH и 120 мкл дистиллированной воды (контроль) или тестируемого экстракта из почвы. Диапазон концентраций токсических веществ: 0.085–0.595 мг/л хлорида меди (II), 1.04–10.38 мг/л малатиона, 0.35–0.85 г/л диазинона.

Активность биферментной системы на основе R и бактериальной люциферазы (L) оценивали по интенсивности свечения с помощью люминометра Luminometer 20/20ⁿ (Promega, США). Реакционная смесь: 350 мкл 0.05 М калий фосфатного буфера pH 6.8; 5 мкл раствора ферментов R+L; 50 мкл 0.0025%-ного тетрадеканала, 100 мкл 0.4 мМ NADH; 10 мкл 0.5 мМ FMN и 50 мкл дистиллированной воды (контроль) или тестируемого экстракта из почвы. Диапазон концентраций токсических веществ: 0.015–0.15 г/л хлорида меди (II), 0.0078–0.78 мг/л малатиона, 0.23–53 г/л диазинона.

Активность триферментной системы на основе R, L и лактатдегидрогеназы (LDH) оценивали по интенсивности свечения на люминометре Luminometer 20/20ⁿ (Promega, США). Реакционная смесь: 300 мкл 0.05 М калий-фосфатного буфера pH 7.1, 5 мкл раствора LDH (0.5 мг/мл), 10 мкл раствора ферментов R и L, 10 мкл 15 мМ лактата, 100 мкл 0.5 мМ NAD⁺, 50 мкл 0.0025%-ного тетрадеканала, 10 мкл 0.5 мМ FMN и 50 мкл дистиллированной воды (контроль) или тестируемого экстракта почвы. Диапазон концентраций

токсических веществ: 0.013 – 13 мг/л хлорида меди (II), 0.22–8.8 мг/л малатиона, 0.037–60 г/л диазинона.

Остаточную активность ферментативной системы (Т) оценивали по формуле: $T = A_c / A_s \cdot 100\%$, где A_c и A_s – соответственно активность ферментов в присутствии контрольного образца и раствора токсиканта или экстракта из почвы. Токсикологический параметр EC_{20} определяли как концентрацию токсиканта, при которой Т составляет 80 %. Все эксперименты выполнены не менее 3 раз.

Р е а к т и в ы . Лиофилизированные препараты *L. Photobacterium leiognathi* (ЕС 1.14.14.3) и *R. Vibrio fischeri* ЕС (1.5.1.29) (производство Лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН, Красноярск), LDH (Sigma-Aldrich, США), FMN и NADH (Serva, Германия), тетрадеканаль (Merck, Германия), NAD^+ (AppliChem, Германия), DL-молочная кислота (Sigma-Aldrich, США), малатион (Алсико-Агропром, Россия), диазинон (МедиЛис, Россия), хлорид меди (II) двухводный марки чда (НПФ Невский химик, Россия).

Результаты и обсуждение

Влияние токсикантов на ферментные системы. На первом этапе исследовали действие водных растворов токсикантов малатиона, диазинона, хлорида меди (II) на активность трех ферментативных систем R, (R+L) и (R+L+LDH) (таблица, образец дН₂O). По параметру EC_{20} установлено, что моноферментная система R малочувствительна к воздействию водных растворов малатиона ($EC_{20} \gg$ ПДК). Поэтому в экспериментах по оценке чувствительности системы R к токсикантам, содержащимся в экстрактах из почв, малатион был

исключен. При работе с би- и триферментной системами анализировали воздействие на активность ферментов каждого из трех токсикантов.

Влияние почв на ферментные системы. На следующем этапе исследовали влияние на ферментативные системы пяти незагрязненных образцов почв с различным содержанием гумуса: песка, легкого суглинка, среднего суглинка, тяжелого суглинка и чернозёма. Показано, что из 5-ти почвенных экстрактов на активность моноферментной системы R существенное ингибирующее воздействие оказывает только экстракт из чернозема ($T = 65 \%$). Активность биферментной системы (R+L) существенно снижалась в присутствии трех из исследуемых почвенных образцов: легкого суглинка ($T = 19 \%$), среднего суглинка ($T = 40 \%$) и чернозема ($T = 20 \%$). На активность триферментной системы (R+L+LDH) ингибирующее воздействие оказали экстракты из песчаной почвы ($T = 56 \%$), тяжелого суглинка ($T = 59 \%$) и чернозема ($T = 36\%$). В дальнейшем для исключения влияния компонентов незагрязненной почвы на результаты ферментативного тестирования в качестве контроля использовали водный экстракт из почвы соответствующего типа.

Влияние токсикантов в экстрактах из почв на ферментные системы. Были проведены модельные эксперименты оценки чувствительности ферментативных систем к воздействию токсических веществ при их внесении непосредственно в экстракты из почв. Варьируя концентрацию загрязнителя, определяли значения его токсикологического параметра EC_{20} , показывающего предел чувствительности к нему системы (таблица). Установлено, что смешивание токсикантов с экстрактом из почв в большинстве случаев приводит к снижению их ингибирующего воздействия на

ферментативные системы. Особенно это выражено для хлорида меди, чувствительность к которому падает на три и один порядок при тестировании этого токсиканта в экстракте из чернозема с помощью моно- и биферментной систем соответственно, и на один порядок при его тестировании в экстракте из среднего суглинка с помощью системы (R+L+LDH).

Кроме того, сравнительный анализ активности ферментных систем в присутствии загрязненных и незагрязненных экстрактов почв показал, что активность R в присутствии экстрактов почв, загрязненных хлоридом меди, не отличается от активности фермента в присутствии экстрактов незагрязненных почв. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что моноферментная система не позволяет фиксировать загрязнение почв хлоридом меди на уровне, близком к ПДК для данного вещества.

Полученные в работе результаты указывают на широкие возможности для управления чувствительностью ферментативных биотестов к токсикантам в почве за счет удлинения цепи сопряжения ферментов или подбора системы, подверженной наименьшему влиянию естественных компонентов почвы. Действительно, повышение сложности системы (от моно- до триферментной) в несколько раз увеличивает чувствительность ферментативного биотеста. Однако, с другой стороны, исследование выявило трудности проведения ферментативного биотестирования почв, связанные с активным влиянием экстрактов из почв как на активность ферментативных систем, так и на их взаимодействие с токсикантами. Полученные результаты о различном воздействии незагрязненных экстрактов из почв на три ферментативные системы открывают возможности для конструирования специализированных ферментативных биотестов для целей

мониторинга экологической безопасности почв различного компонентного состава и загрязненности.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект 16-14-10115).

Список литературы

ГН 1.2.3111-13. 2014. Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень). М.: Фед. Центр гигиены и эпидемиол. Роспотребнадзора. 131 с. (*GN 1.2.3111-13. 2014.* Hygienic norms of pesticide contents in environmental objects (list). Moscow: Federal Hygienic and Epidemiological Center of Rospotrebnadzor. 131 p.)

ГН 2.1.7.2041-06. 2006. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве. М.: Фед. Центр гигиены и эпидемиол. Роспотребнадзора. 15 с. (*GN 2.1.7.2041-06. 2006.* Maximum permissible concentration (MPC) of chemical substances in soil. Moscow: Federal Hygienic and Epidemiological Center of Rospotrebnadzor. 15 p.)

ГОСТ 17.4.4.02-84. 2008. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. М.: Стандартиформ. 7 с. (*GOST 17.4.4.02-84. 2008.* Nature protection. Soils. Methods for sampling and preparation of soil for chemical, bacteriological, helminthological analysis. Moscow: Standartinform. 7 p.)

Добровольский Г. В. 2003. Структурно функциональная роль почв и почвенной биоты в биосфере. М.: Наука. 364 с. (Dobrovolsky G. V. 2003. Structural and functional role of soils and soil biota in the biosphere. Moscow: Nauka. 364 p.)

МР 11-1/134-09. 2000. Определение общей токсичности почв по интенсивности биолюминесценции бактерий. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. 21 с. (МР 11-1/134-09. 2000. Determination of soil in intensity of bioluminescence general toxicity of bacteria. Moscow: Federal Hygienic and Epidemiological Center of Rospotrebnadzor. 21 p.)

Колесников С. И., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф. 2006. Экологическое состояние и функции почв в условиях химического загрязнения. Ростов н/Д: Ростиздат. 385 с. (Kolesnikov S. I., Kazeev K. Sh., Valkov V. F. 2006. An ecological condition and functions of soils in the conditions of chemical pollution. Rostov on / D: Rostizdat. 385 p.)

Терехова В. А. 2011. Биотестирование почв: подходы и проблемы. Почвоведение. 2 : 190—198. (Terekhova V.A. 2011. Soil bioassay: Problems and approaches. Eurasian Soil Science. 2 : 173—179.)

Kratasyuk V. A., Esimbekova E. N. 2015. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology. Combina. Chem. High Throughput Screening. 18 : 952 — 959.

Таблица

Параметр ЕС₂₀ (мг/кг) для исследованных загрязнителей при использовании ферментативных тест-систем R, (R+L) и (R+L+LDH)

Образец	Малатион			Диазинон			Хлорид меди (II)		
	R	R+L	R+L+ LDH	R	R+L	R+L+LDH	R	R+L	R+L+LDH
дН ₂ О	4400	39	2	350	1.3	0.35	0.4	0.06	0.004
Песок	-	30	1	1500	1.15	0.15	169.8	0.21	0.004
Легкий суглинок	-	600	20	300	9	3	6.35	0.12	0.004
Средний суглинок	-	130	20	1800	2.4	0.5	17	0.03	0.16
Тяжелый суглинок	-	18.5	8	300	16.5	0.15	21.25	0.55	0.04
Чернозем	-	39	1	3000	1.7	0.3	255	0.7	0.0045
ПДК	1.0 ^a			0.1 ^a			3.0 ^b		

ПДК в почве согласно гигиеническим нормативам ^a (ГН 1.2.3111-13, 2014) и ^b (ГН 2.1.7.2041-06, 2006).

ENZYMATIC BIOASSAY OF SOIL: SENSITIVITY COMPARISON OF
MONO-, DOUBLE- AND TRIPLE- ENZYME SYSTEMS TO SOIL TOXICANTS

O. S. Sutormin,^{1,} E. M. Kolosova,¹ E. V. Nemtseva,^{1,2} O. V. Iskorneva,¹*

A. E. Lisitsa,¹ V. S. Matvienko,¹ E. N. Esimbekova,^{2,1} V. A. Kratasyuk^{1,2}

¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041,

and ² Institute of Biophysics Siberian Branch of RAS, Krasnoyarsk, 660036;

* e-mail address: OSutormin@sfu-kras.ru

In this paper, we have investigated the possibilities of application of enzymatic systems with increasing chain length as a bioassay to evaluate the soil contamination status. The sensitivity of monoenzyme reaction as well as double- and triple-enzyme chains based on NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and luciferase of luminous bacteria and lactate dehydrogenase to pesticides and copper ions in water and water extracts from soils were estimated. For this, the toxicological parameter IC₂₀ reflecting the sensitivity limit of the enzyme system to the toxicant was used. It was revealed that elongation of the coupled enzyme chain (from mono- to triple-enzyme) increases the sensitivity of the bioassay, in some cases by several orders of magnitude. This pattern can be used as a tool to improve the properties of enzymic bioassays. The effect of extracts from uncontaminated soils of various types on enzymatic systems also differs, which makes possible to design the specialized enzymatic bioassays as well.

Key words: bioluminescent analysis, soil, enzymatic toxicity bioassays, ecological monitoring, bacterial luciferase, NADH:FMN-oxidoreductase, lactate dehydrogenase, coupled enzyme systems.

Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би- и три-ферментной систем.

Сутормин О. С., Колосова Е. М., Немцева Е. В., Искорнева О. В., Лисица А. Е., Матвиенко В. С., Есимбекова Е. Н., Кратасюк В. А.

Сутормин Олег Сергеевич, 660041, г. Красноярск, пр. Свободный д.79, ауд. 13-08, тел. +7 391 206-23-07, тел.моб. +7 933 996-55-54, факс +7 391 206-21-65, e-mail: OSutormin@sfu-kras.ru.